نشریه علمی زراعت و اصلاح نباتات ایران
جلد ۱۵، شماره ۳، پائیز ۱۳۹۸، صفحات ٦٤-٤٩

ISSN NO: 2008-8485

آنالیز مولکولی و تبدیل میکوتوکسین دی اکسی نیوالنول به فرم ۳- استیل در ۲۰ رقم گندم دوروم خوزستان از طریق تکنیک PCR و تعیین ژن مقاومت AYT1

Molecular analysis and reduction of mycotoxin deoxynivalenol to 3-acetyl form in 20 durum wheat cultivars of Khuzestan through PCR technique and determination of AYT1 resistance gene

سید سعید نوری نیا[1]*، ندا باغستانی[2]

تاریخ دریافت: ۹۹/۸/۲۲ تاریخ پذیرش: ۹۹/۱۲/۲۱

چکیده

این پژوهش به منظور ارزیابی واکنش ۲۰ توده گندم دوروم بومی خوز ستان، موجود در کلک سیون بخش تحقیقات غلات مؤ سسه تحقیقات ا صلاح و تهیه نهال و بذر نسبت به بیماری بلایت فوزاریومی سنبله طی دو سال زراعی ۹٦-۱۳۹۵ و ۱۳۹۷-۹۸ در شرایط مزرعه در دو منطقه‌ی مختلف، خوزستان، با دو شرایط آب و هوایی، اجرا گردید. صفات مورد مطالعه شامل خو شه‌های آلوده، آلودگی سنبلچه، آلودگی بذر، تراکم خو شه، ارتفاع بوته و عملکرد بیولوژیک بود که به منظور لندازه گیری و تعیین فوا صل ژنتیکی و نیز الگو پذیری تنوع در اجزاء مقاومت‌به فوزاریوم سنبله گندم، از روش تجزیه خو شه‌ای ا ستفاده شد. ارزیابی توده‌های آزمایشی با ا ستفاده از روش ا سپورپا شی در مزرعه نشان داد که بیشتر توده‌های مورد برر سی، از نظر میانگین شاخص بیماری از مقاومت مطلوبی در برابر بیماری برخوردار هستند. به نظر می‌ر سد که علت مقاومت ا ساس ژنتیکی دا شته و به وجود مقاومت نوع I در آن‌ها مربوط می شود. از بیست رقم گندم دوروم مورد برر سی می‌توان به عنوان والدهای مقاوم به بیماری در تلاقی‌های مربوط به برنامه‌های ا صلاح گندم ا ستفاده نمود، نتایج نشان داد، که ژن AYT1 در ارقام گندم مورد برر سی به عنوان ژن مقاوم، بیان می شود همچنین با ا ستفاده و معرفی تکنیک PCR و استفاده از نشانگرهای ملکولی SSR در این تحقیق به منظور تکثیر یک نسخه منفرد یا نسخه‌های کمی از یک قطعه DNA با توالی خاص به تعداد هزار یا میلیون‌ها ن سخه، جهت د ستیابی به ماهیت ژنتیکی ارقام می‌توان این روش را به عنوان روش مطلوب جهت تکثیر ژن‌های مقاوم در این پژوهش معرفی نمود.

نکات کلیدی: بلایت فوزاریومی گندم دوروم، نشانگرهای SSR، میکوتوکسین دی اکسی نیوالنول، PCR.

[1]- نویسنده، کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی و اصلاح نباتات،پژوهشگر.

۲- نویسنده، کارشناس تولیدات زراعی.

مقدمه

با توجه به افزایش رشد جمعیت و نیاز به تأمین امنیت غذایی، افزایش تولید در واحد سطح محصولات زراعی می‌تواند به عنوان یک راهبرد اساسی در حل مشکل تامین غذا به شمار آید. در میان گیاهان زراعی، گندم با دارا بودن مواد غذایی باارزش مانند انواع پروتئین ها، ویتامین ها و مواد معدنی، حدود ۲۵٪ کالری غذایی مردم جهان را تأمین می‌نماید (Salunkhe et al., 1985). با توجه به محدودیت های افزایش سطح زیرکشت گندم و پایین بودن میانگین عملکرد گندم در کشور افزایش عملکرد می‌تواند یکی از راه کارهای عملی برای پاسخگویی به نیازهای کشور باشد. از عواملی که باعث کاهش عملکرد در واحد سطح می‌گردند، می‌توان به تنش‌های غیرزیستی و تنش‌های زیستی مانند آفات و بیماری‌ها اشاره نمود. یکی از تنش‌های زنده، بیماری بلایت فوزاریومی سنبله گندم یا FHB که عموماً تحت عنوان (اسکب) نامیده می شود، یکی از بیماری های مخرب در مناطق گرم و مرطوب کشت گندم در جهان می‌باشد (Bai and Shaner, 1994).

بلایت فوزاریومی سنبله که توسط گونه‌های مختلف قارچ *Fusarium* به ویژه گونه‌ی *Fusarium graminearum* ایجاد می شود، یکی از مهم‌ترین بیماری‌های گندم در ایران است که به ویژه در اقلیم گرم و مرطوب کشور باعث کاهش عملکرد و کیفیت محصول می‌شود. مایکوتوکسین‌ها دسته‌ای از مواد سمّی و آلاینده مواد غذایی، خوراک دام و طیور هستند که به طور طبیعی از انواع خاصی از کپک‌ها (قارچ ها) تولید می شوند. این کپک‌ها می‌توانند مایکوتوکسین‌ها را در انواع مواد غذایی از جمله غلات، میوه های خشک، دانه‌ها و ادویه‌ها تولید کنند. رشد این گونه کپک‌ها می‌تواند قبل و یا پس از برداشت محصول، طی نگهداری و انبار نمودن مواد غذایی در شرایط گرم و مرطوب صورت بگیرد (Salunkhe et al., 1985). متاسفانه بیشتر مایکوتوکسین‌ها بسیار پایدار هستند و طی فرایندهای تولید غذا، انجماد و پختن از بین نمی‌روند (Phillips et al., 1990). تاکنون بیش از چند صد مایکوتوکسین شناسایی شده‌اند که از جمله مایکوتوکسین‌های خطرناک برای سلامت انسان و سایر موجودات زنده می توان به، آفلاتوکسین ها، اکراتوکسین A، پاتولین، فومانایزین ها، زیرالنون، دی اکسی نیوالنول اشاره نمود. مصرف مایکوتوکسین‌ها توسط انسان می‌تواند به طور مستقیم از طریق مواد غذایی آلوده به مایکوتوکسین و یا غیرمستقیم از طریق مصرف فرآورده های حیوانات در معرض مایکوتوکسین‌ها (مانند شیر گاو) صورت بگیرد. این مایکوتوکسین ها که توسط قارچ هایی از جنس، *Fusarium*، *Myrothecium*، *Stachybotrys*، *Trichoderma*، *Trichothecium*، تولید می شوند تاثیرات مخربی را بر زندگی انسان و همچنین موجودات زنده خواهند گذاشت (Shima et al., 1997). مایکوتوکسین ها از متابولیسم ثانویه قارچ ها ایجاد می شوند که به دلیل سمی بودن تأثیر منفی روی مهره‌داران نیز دارند (Shima et al., 1997). بسته به نوع و مقدار ماده، مایکوتوکسین‌ها سرطان‌زا هستند و در ایجاد جهش ژنتیکی و کاهش ایمنی بدن انسان نقش بسزائی دارند و در مواقعی به خصوص باعث ایجاد جهش ژنتیکی خواهند شد(Jefferies et al., 2000). منبع اصلی ورود مایکوتوکسین‌ها به زنجیره غذایی، غلات هستند و حدود ۴۰۰ نوع از مایکوتوکسین‌ها در دنیا شناخته شده‌اند که ازنظر ساختار شیمیایی با یکدیگر متفاوتند اما حدود ۲۵ نوع از آنها ممکن است در غذاها در حد بالایی یافت شوند (Irani et al., 2015). از عوامل تاثیر آنها به طور کلی می‌توان به تغییر در ساختار پروتوئین و ایجاد پروتوئین هایی ناقص و ایجاد جهش، تاثیر بر مراحل تقسیم سلولی از جمله، پروفاز و اینترفاز،

تغییرات در فعالیت میتوکوندری ها، ایجاد تغییرات در غشای پلاسمایی، اشاره داشت. مهمترین مایکوتوکسین آلوده موجود در طبیعت، دی اکسی نیوالنول (DON) است که از قارچ *F. graminearum* به وجود می‌آید و یکی از عوامل تولید بیماری فوزاریومی سنبله در گندم و تعداد دیگری از غلات است (Shima et al., 1997). کاهش خطر(DON) در طبیعت امکان پذیر است، و سم‌زدایی آن به دو طریق شیمیایی و آنزیمی صورت می‌گیرد. بهترین مواد برای کاهش اثر سمیت شیمیایی DON (دی اکسی نیوالنول) استفاده از عنصر سدیم متابی سولفیت که یک ترکیب غیر آلی فرمول شیمیایی (NA2 O2 S5) است خواهد بود، همچنین بهترین مواد برای کاهش اثر سمیت انزیمی در DON الکل دهیدروژناز (ADHs) که جزو خانواده اکسیدوردکتازها است و می‌تولند الکل را به آلدهید تبدیل کند خواهد بود، بسیاری از گونه‌های قارچی با تولید مایکوتوکسین‌های پایدار در مواد غذایی، می‌توانند عامل خطرناکی برای انسان باشند(Magan, N, 2006). گندم (نان یا دوروم)، از مواد در معرض آلودگی به این نوع از قارچ‌ها است و کپک‌ها عمده‌ترین عامل میکروبی آلوده کننده نان هستند. هدف از این پژوهش، بررسی آلودگی میکروبی و شیمیایی ۲۰ رقم گندم نان، به کپک و مخمرهای پاتوژن از طریق سم‌زدایی در دو منطقه خوزستان و همچنین استفاده از نشانگرهای ملکولی SSR به منظور تکثیر یک نسخه منفرد یا نسخه‌های کمی از یک قطعه DNA با توالی خاص، به تعداد هزار یا میلیون‌ها نسخه، جهت دستیابی به ماهیت ژنتیکی گونه ها و معرفی تکنیک Polymerase Chain Reaction، به عنوان روشی مطلوب و کارآمد در دستیابی به اطلاعات ژنتیکی و فیزیکی قارچ‌ها و گیاهان، جهت خنثی نمودن اثر سمیت قارچ‌ها و تکثیر ژن‌های مقاوم در گیاهان گندم دوروم است.

مواد و روش ها (Materials and methods)

نتایج تکمیلی و اولیه‌ی این ۲۰ رقم گندم دوروم توسط اینجانب در تحقیقی دیگر، در سال زراعی ۹۳-۹۲ در مزرعه تحقیقاتی مشرف به مزارع تحقیقاتی دانشگاه آزاد اسلامی واحد اهواز، در ۱۰ کیلومتری شمال شرقی اهواز در منطقه ویس و در حاشیه شرقی رودخانه کارون با عرض جغرافیایی ۳۱ درجه و ۳۶ دقیقه شمالی، طول جغرافیایی ۴۸ درجه و ۵۳ دقیقه شرقی و ارتفاع ۵۰ متر از سطح دریا، اجرا شد. براساس آمار هواشناسی بلند مدت ۳۰ ساله، شهر ویس با داشتن دمای متوسط حداقل ۱۹/۴۵ و متوسط حداکثر ۲۷/۲ درجه سانتی‌گراد و متوسط بارندگی سالیانه ۲۷۰ میلی‌متر، از لحاظ اقلیمی جزء مناطق خشک و نیمه‌خشک محسوب می شود، از این رو به طور تقریبی شرایط مطلوبی جهت بروز بیماری، همچون دی اکسی نیوالنول که آلوده‌ترین مایکوتوکسین موجود در طبیعت است.

پودر کردن نمونه گیاهی (Powdering plant samples)

ابتدا ۱۵۰ میلی‌گرم برگ (گیاهان ۱۸-۱۲ روزه) را در هاون چینی ریخته و به‌مقدار لازم به آن نیتروژن مایع اضافه گردید، سپس برگ را کوبیده و خرد نموده تا به صورت پودر شده در آمد. برگ پودر شده را در یک میکروتیوب ۲ میلی لیتری ریخته، سپس ۵۰۰ میکرولیتر بافر استخراج به‌هر نمونه پودر شده اضافه گردید.

استخراج DNA ژنومی (Genomic DNA extraction)

استخراج DNA ژنومی ۲۰ رقم گندم دوروم بر اساس روش دلاپورتا و همکاران صورت گرفت (Dellaporta et al., 1983). پودر برگ را با بافر استخراج مخلوط (Mixed) کرده تا به صورت یک محلول سبز رنگ همگن درآمد، آنگاه به مدت ۳۰ دقیقه

در حمام بن‌ماری با دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. در این مدت نمونه‌ها هر ۵ دقیقه یک‌بار بیرون آورده شده و چند بار سر و ته گردیدند. قبل از انجام مرحله فوق باید بافر استخراج را در حمام بنماری با دمای ۶۵ درجه قرار داد تا (SDS) موجود در آن خوب حل شود. زیرا (SDS) در دمای پایین رسوب می‌کند و نمی‌تواند کارآیی لازم را داشته باشد. بعد از خنک شدن نمونه‌ها، ۲۰۰ میکرولیتر استات پتاسیم ۵ مولار به‌هر تیوپ اضافه کرده و بعد از چندین‌بار سر و ته کردن (۱-۲ دقیقه)، نمونه‌ها به مدت ۱۵ دقیقه روی یخ (۴ درجه سانتی‌گراد) قرار گرفتند. استات پتاسیم (باعث از بین رفتن اثر دترجنت (SDS) و جدا شدن آن از DNA می‌شود).

به هر نمونه ۵۰۰ میکرولیتر محلول فنل: کلروفورم: ایزوآمیل الکل به ترتیب با نسبت های (۱:۲۴:۲۵) اضافه و تیوپ‌ها سر و ته شدند تا یک محلول یکنواخت تشکیل شود، سپس نمونه‌ها به مدت ۱۵ دقیقه با سرعت ۵۰۰۰ rpm در دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شدند، فاز رویی (Supernatant) به یک تیوپ جدید ۱/۵ میلی‌لیتری با استفاده تیپ دهانه گشاد (Cut tip) منتقل شد و هم حجم آن ایزوپروپانول سرد یا دو حجم اتانول مطلق همراه با ۰/۱ در صد حجم استات سدیم ۳ مولار با (pH=۵/۲) اضافه گردید، سپس نمونه‌ها به آرامی سر و ته شدند. کلاف سفید رنگ DNA در این مرحله قابل مشاهده است. در این مرحله سانتریفیوژ نمونه‌ها به مدت ۱۵ دقیقه با سرعت ۵۰۰۰rpm در دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد صورت گرفت. به آرامی فاز رویی را دور ریخته و رسوب DNA با ۳۰۰ میکرولیتر اتانول ۷۰ در صد سه مرتبه شستشو داده شد، سپس نمونه‌ها به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق و زیر هود قرار داده شد، تا رسوب DNA خشک گردد. خشک کردن در شرایط خلاء و به مدت طولانی باعث خرد شدن DNA ژنومی می شود. به هر میکروتیوپ ۳۰۰ میکرولیتر آب مقطر استریل افزوده شد و جهت حل شدن کامل رسوب نمونه‌ها به‌مدت یک شب در دمای اتاق نگهداری شدند. به هر نمونه ۲ میکرولیتر آنزیم RNase A (۱۰mg/ml) اضافه گردید، سپس در دمای ۳۷ درجه به مدت ۲ ساعت قرار داده شد. پس از انجام استخراج DNA، کیفیت و کمیت DNA استخراجی با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتری (طیف سنج مرئی و ماوراء بنفش و یا دستگاه UV-Vis Spectrometer که دستگاهی است برای اندازه‌گیری مقدار یک ماده بر اساس میزان جذب الکترومغناطیسی آن ماده می باشد) تعیین شد. نسبت عددی حاصل برای نمونه‌های DNA استخراجی در این تحقیق بین ۱/۸ تا ۱/۹۷ متغیر بود که نشان می‌دهد کیفیت آن‌ها برای انجام آزمایشات PCR مطلوب بوده است.

برای تعین غلظت DNA از فرمول زیر استفاده می‌شود:

غلظت DNA برحسب نانو گرم در میکرولیتر = $A_{260} \times DF \times 50$

DF ضریب رقت است و با توجه به میزان دفعاتی که محلول پایه رقیق شده است تعیین می‌گردد. عدد ۵۰ نیز به این دلیل در این فرمول نوشته شده زیرا OD=۱ برابر با تقریباً ۵۰ نانوگرم بر میکرولیتر DNA دو رشته‌ای است که این میزان تعیین کیفیت DNA استخراج شده، و اینکه مشخص گردد DNA ژنومی هر رقم سالم بوده و شکستگی ندارد.

الکتروفورز (Electrophoresis)

از روش الکتروفورز(برای تفکیک و جدا سازی اسیدهای نوکلئیک که اساس این روش بر پایه اختلاف بار الکتریکی است) در ژل آگارز ۰/۸ در صد با بافر TAE یک برابر استفاده گردید. جهت رنگ‌آمیزی از اتیدیوم بروماید با غلظت (۱۰mg/ml) ۲/۵ میکرولیتر برداشته و پس از رسیدن دمای ژل آگارز به ۴۰ تا ۵۰ درجه، به آن اضافه گردید. سپس ۵ میکرولیتر از نمونه

DNA استخراج شده با ۱/۵ میکرولیتر بافر بارگذاری و مخلوط در کنار نشانگر 1Kb در چاهک‌های ژل آگارز بارگذاری شد. الکتروفورز با ولتاژ ۵ ولت بر سانتی متر انجام شد. زمانی که رنگ برومونول بلو، ۶۰ تا ۷۰ درصد ژل را طی کرده بود، دستگاه خاموش و با استفاده از دستگاه ژل داکیومنتیشن عکس ژل‌ها تهیه گردید. پس از تعیین کمیت و کیفیت نمونه ها از آن ها محلول های کاری با غلظت (۱۰ng/µl) تهیه و در ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید و نمونه‌های DNA اصلی به (۲۰-) منتقل شدند. در این تحقیق از ۲۰ جفت آغازگر اختصاصی گندم استفاده گردید. اساس انتخاب آغازگرها بیشتر بر مبنای پیوستگی با مکان های ژنی‌کنترل کننده صفات کمی و کیفی است (Ellis et al., 2002). همچنین با استفاده از نرم‌افزار (OVITO) که یک نرم افزار بیوانفورماتیکی گرافیکی می‌باشد، که بیشتر در زمینه‌ی آنالیز و مشاهده‌ی ساختارهای اتمی شبیه‌سازی شده است، انالیز انجام گرفت.

تهیه مایه تلقیح، آلودگی مصنوعی و ارزیابی بیماری (Inoculation preparation, artificial contamination and disease assessment)

۱۰ رقم مورد بررسی در بین ۱۰۰ نمونه مبتلا به بیماری از دو منطقه مختلف خوزستان جمع آوری و مورد شناسایی قرار گرفتند و ۱۰ رقم دیگر قبلا" در واحد بیماری ها، بخش تحقیقات غلات خوزستان" شناسایی شده بودند، که بر اساس شدت بیماریزایی انتخاب شدند. قارچ عامل بیماری از سنبله‌های گندم آلوده ارقام مختلف گندم دوروم با استفاده از محیط کشت PDA جدا سازی شد. پس از جدا سازی، خالص سازی ارقام مورد بررسی با روش تک اسپور (اسپور پاشی) و با استفاده از تکنیک مخطط کردن روی محیط آب و آگار ۲٪ انجام شد. همچنین تشخیص ارقام آلوده با استفاده از کلیدهای تشخیص گونه‌های فوزاریوم صورت پذیرفت.

برای تهیه مایه تلقیح از روش وگنر استفاده شد (Wegener, 1992). در این روش در ارلن هایی به حجم ۲۵۰ میلی‌لیتر مقدار ۲/۵ گرم کاه گندم به همراه ۱۲۵ میلی‌لیتر آب مقطر ریخته شده و در اتوکلاو استریل شدند، عمل استریل کردن سه مرتبه تکرار گردید. قطعه کوچکی به قطر حدود ۵-۳ میلی متر از میسلیوم های جدایه مورد نظر به همراه محیط کشت برداشته شده و در داخل ارلن‌ها ریخته شد. سپس ارلن‌ها در دمای ۳۰-۲۵ درجه سانتی گراد روی شیکر دورانی گذاشته شد. پس از گذشت حدود ۹۶ ساعت اسپورهای فراوانی از جدایه مورد نظر به دست آمد. مایه تلقیح تهیه و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد تا زمان استفاده نگهداری شد. غلظت سوسپانسیون به ۱۰۴×۱۵ اسپور در هر میلی‌لیتر تنظیم گردید. اندازه‌گیری قدرت تهاجم مایه تلقیح طبق روش لمن و همکاران صورت گرفت (Lemmens et al., 1993). در آغاز و پایان دوره آلودگی نشان داد که توانایی تهاجم در طول دوره آلودگی ثابت بوده است. در آلودگی مصنوعی در زمانی که بیش از ۵۰ درصد گیاهان هر کرت به مرحله گلدهی رسیده بودند، انجام شد و پس از دو روز دوباره تکرار شد. آلودگی توسط یک دستگاه سمپاشی موتوری پشتی و افشانه کردن ۶۵ میلی‌لیتر از سوسپانسیون، به صورت یک روز در میان و در هنگام عصر، پیش از غروب آفتاب انجام شد. سیستم مه‌پاش رطوبت مورد نیاز را به مدت ۱۸ ساعت پس از آلودگی فراهم نمود. در همان سال در صد پیشرفت بیماری، توسط شاخصی بر مبنای صفر در صد (بدون بیماری) تا ۱۰۰ در صد (آلودگی کامل) ۱۰، ۱۴ و ۱۸ روز پس از آلودگی ارزیابی شد.

درصد آلودگی سنبله (Percentage of spike contamination)

اگرچه محاسبه درصد آلودگی سنبله به تنهایی نشان دهنده سطح مقاومت یا حساسیت ارقام مورد نظر نیست ولی شدت اپیدمی‌را نشان می‌دهد. برای تعیین این پارامتر از هر کرت ۲۰ خوشه را به طور تصادفی انتخاب و تعداد خوشه‌های آلوده را شمارش و در صد آن را نسبت به کل خوشه‌ها (۲۰ عدد) محاسبه نمودیم. روشی که در این پژوهش مورد استفاده قرار گرفت در حقیقت تلفیقی از روش‌های یاد شده است که در آن شاخص بیماری از فرمول زیر مورد محاسبه قرار می‌گیرد. البته در این محاسبه ۲۰ خوشه استفاده گردید.

در این تحقیق عدد ۱ نشانه عدم آلودگی و عدد ۵ نشانه حداکثر تیپ آلودگی بوده است و تقسیم سطح آلودگی هر تیمار بر حاصلضرب ۲۰×۵ در صد آلودگی سنبلچه یا شاخص بیماری DIX را نشان می‌دهد که در آن: تیپ آلودگی اول، ۳۰٪ خوشه‌ها آلوده است، تیپ آلودگی دوم، ۴۵٪ خوشه‌ها آلوده است، تیپ آلودگی سوم، ۷۱٪ خوشه‌ها آلوده است، تیپ آلودگی چهارم، ۸۵٪ خوشه‌ها آلوده است و تیپ آلودگی پنجم، ۸۸٪ خوشه‌ها آلوده است.

نکته: در این تحقیق جهت رسیدن به نتایج دقیق‌تر از درصد آلودگی سنبله‌ها پنج نوع تیپ آلودگی در نظر گرفته شد.

جدول ۱.درصد آلودگی سنبله ها با استفاده از چهار تیپ آلودگی

Table 1. Percentage of spike contamination using four types of contamination

درصد آلودگی Percentage of pollution	تیپ آلودگی Pollution type	شاخص بیماری DIX
%30	17.9	1
%45	9.3	2
%71	36.3	3
%85	13.5	4
%88	23	5

تیپ آلودگی (Pollution type)

تیپ آلودگی، نتیجه نهایی اثر متقابل میزبان و عامل بیماری است و معمولاً تیپ آلودگی ۱ مصون و تیپ آلودگی ۵ آلودگی کامل و حساسیت گیاه می‌باشد. با توجه به نتایج به دست آمده (جدول ۱) در بررسی مقاومت به بیماری اسکب در ارقام انتخابی از نمونه‌های مورد ارزیابی، درمرحله گیاه کامل: ۲۳ در صد از ارقام دارای تیپ آلودگی ۵، ۱۳/۵ در صد از ارقام دارای تیپ آلودگی ۴، ۳۶/۳ در صد دارای تیپ آلودگی ۳، ۹/۳ در صد تیپ آلودگی ۲ و بقیه یعنی ۱۷/۹ در صد دارای تیپ آلودگی ۱ بودند که نمونه‌های مقاوم در این گروه قرار داشتند.

ارزیابی ارقام با نشانگرهای مولکولی (Evaluation of cultivars with molecular markers)

جدول۲. نشانگرهای مولکولی SSR مورد استفاده در غربال‌گری ژنتیکی ۲۰ رقم گندم دوروم

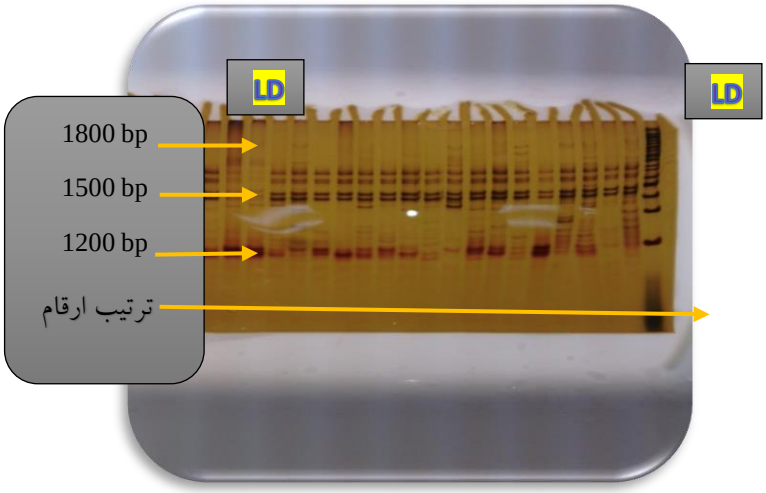
Table 2. SSR Molecular Markers Used in Genetic Screening of 20 Durum Wheat cultivars

Designation	Left primer	Right primer	An. Temp.
GWM18	TGGCGCCATGATTGCATTATCTTC	GGTTGCTGAAGAACCTTATTTAGG	۵۰°C
GWM120	GATCCACCTTCCTCTCTCTC	GATTATACTGGTGCCGAAAC	۶۰°C
GWM219	GATGAGCGACACCTAGCCTC	GGGGTCCGAGTCCACAAC	۶۰°C
GWM234	GAGTCCTGATGTGAAGCTGTTG	CTCATTGGGGTGTGTACGTG	۵۵°C
GWM251	CAACTGGTTGCTACACAAGCA	GGGATGTCTGTTCCATCTTAG	۵۵°C
GWM340	GCAATCTTTTTTCTGACCACG	ACGAGGCAAGAACACACATG	۶۰°C
GWM389	ATCATGTCGATCTCCTTGACG	TGCCATGCACATTAGCAGAT	۶۰°C
GWM400	GTGCTGCCACCACTTGC	TGTAGGCACTGCTTGGGAG	۶۰°C
GWM408	TCGATTTATTTGGGCCACTG	GTATAATTCGTTCACAGCACGC	۵۵°C
GWM577	ATGGCATAATTTGGTGAAATTG	TGTTTCAAGCCCAACTTCTATT	۵۵°C
Xwmc420	TTACTTTTGCTGAGAAAACCCT	ATCGTCAACAAAATCTGAAGTG	۵۰°C
Xwmc89	TTGCCTCCCAAGACGAAATAAC	ATGTCCACGTGCTAGGGAGGTA	۶۰°C
Xgwm601	TTAAGTTGCTGCCAATGTTCC	ATCGAGGACGACATGAAGGT	۶۰°C
Xwmc48	ACGTGCTAGGGAGGTATCTTGC	GAGGGTTCTGAAATGTTTTGCC	۵۵°C
Xwmc603	CGCCTCTCTCGTAAGCCTCAAC	ACAAACGGTGACAATGCAAGGA	۵۵°C
Xbarc108	GCGAAATGATTGGCGTTACACCTGTTG	GCGGGTCGTTTCCTGGAAATTCATCTAA	۶۰°C
Xgwm413	GATCGTCTCGTCCTTGGCA	TGCTTGTCTAGATTGCTTGGG	۶۰°C
Xgwm617	CTCCGATGGATTACTCGCAC	GATCTTGGCGCTGAGAGAGA	۶۰°C
Xbarc40	GCGGCATTGACAAGACCATAGC	GCCGCCTACCACAGAGTTGCAGCT	۵۵°C
Xgdm132	ACCGCTCGGAGAAAATCC	AGGGGGGCAGAGGTAGG	۵۵°C

همچنین در میان موادی که به عنوان زمینه برای الکتروفورز به‌کار می‌روند پلی‌اکریلامید بیشترین کارایی را برای برر سی نمونه‌های DNA و پروتئین دارد، زیرا وضوح و شفافیت باندها، تشخیص و قابل تفکیک شدن آن ها در این محیط ب سیار بالا ا ست و به‌راحتی سنجش‌های کمی روی آن انجام می‌شود.

رنگ‌آمیزی با نیترات نقره و حذف ناخالصی
Staining with silver nitrate and removal) (of impurities

در این پژوهش از روش رنگ‌آمیزی نیترات نقره استفاده گردید که برای جلوگیری از انتشار مولکول‌های ا سیدهای نوکلئیک به داخل زمینه ژل بکار می رود و به حذف و خنثی شدن مواد شیمیایی ناخوا سته کمک می‌کند همچنین ژل را در ظرف حاوی محلول سود ۳ در صد و فرمالدئید نیم در صد تا زمان ظهور باندها نگه داشته و به آرامی تکان داده می‌شود. با ظهور اولین باندها جهت جلوگیری از تیرگی ژل و تثبیت باندها می‌توان از محلول مرحله اول مجدد استفاده کرد.



شکل ۱- نتایج حاصل از ژل پلی اکریلامید برای ۲۰ رقم گندم دوروم برای نشانگر GWM340 در دو سوی ژل، (Ladder 50bp) قرار گرفته است

Figure 1- Results of polyacrylamide gel for 20 cultivars of durum wheat for GWM340marker on both sides of the gel (Ladder 50bp)

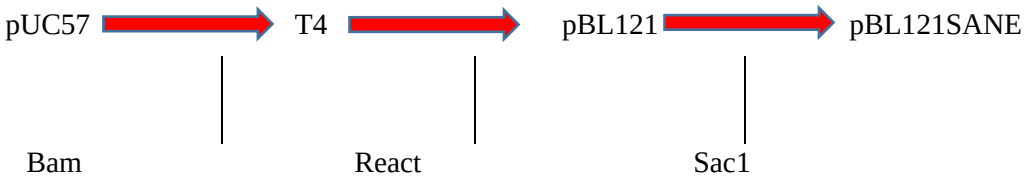
عمل تلقیح و آلوده سازی در بی ست رقم گندم دوروم باح ضور ژن مقاومت AYT1 انجام گرفت. برای ان جام نوترکیبی ابتدا اگرو باکتری حاوی ژن مقاومت AYT1 در سو سپان سیون محیط LB محلول حاوی 100 mg/ml کاناماي سین (Kanamycin A) ک شت شد. با ات صال ژن م قاو مت (AYT1) به ریبوزوم باکتری، مانع سنتز پروتئین در باکتری می‌شد. در نتیجه بر اثر نفوذ این ژن به درون پو شش سلول‌های باکتریایی وابسته به اکسیژن(سلول هایی در باکتری که نیاز شدید به اکسیژن دارند) باعث کاهش اثر سمیت و ضعف در باکتری می‌شد. همچنین دمای مورد نیاز محیط ک شت ۲۶ درجه سانتی‌گراد تنظیم و محلول باکتری در OD= 0/6 تهیه شد. این کار بر ا ساس پروتوکول مورا شیگ و سکوگ صورت گرفت(Murashige & Skooge, 1962). همچنین PH=5 برای محیط تنظیم گردید.

نکته: نوع و میزان آلودگی به مایکوتوک سین‌ها وابستگی زیادی به شرایط و محیط دارد. همچنین در هر

منطقه جغرافیایی نیز شرایط فصلی و محلی در طول مراحل رشد گندم از اهمیت زیادی در تغییرات میزان سمیت مایکوتوکسین‌ها برخوردار است. به طور کلی شرایط محیطی، رطوبت بیش از حد محیط رشد، شدت دما، شرایط خشکی، آسیب‌های حشرات، سیستم‌های برداشت و روش‌های زراعی می‌توانند سبب ایجاد استرس و مستعد کردن گندم به قارچ‌ها شده و آلودگی به مایکوتوکسین را افزایش دهد.

نتایج و بحث

پس از تعیین توالی ژنی و انتقال این توالی به باکتری در تعیین ژن مقاومت AYT1 پس از تایید توسط توالی‌یابی ژنتیکی نشانگرهای مولکولی SSR (جدول ۲)، دو آنزیم Bam1 و Sac1 از پلاسمید pUC57 گرفته شده اند نقش اساسی داشتند و استفاده مستقیم از آنزیم T4 به عنوان آنزیم سوم در بافر طراحی، به جای ژن Gus با پلاسمید pBL121 تلفیق و ژن جدید pBL121SANE جهت تعیین گیاهان نوترکیب حاصل شد.

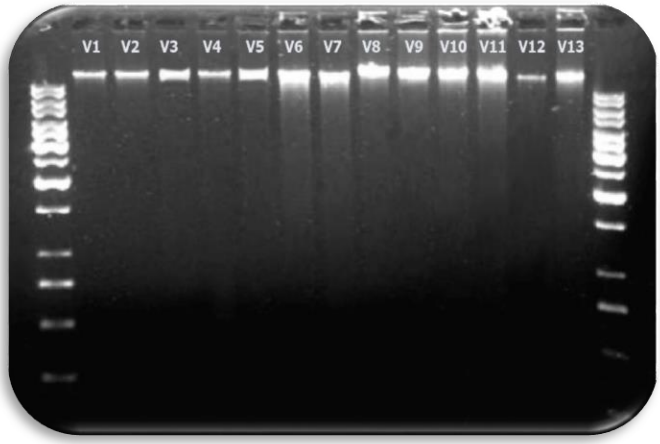


شکل۲- جایگزینی ژنی و تعیین آنزیم جدید در تولید گیاهان نوترکیب گندم و دستیابی به ژن مقاومت AYT1

Figure 2. Gene replacement and determination of new enzymes in the production of recombinant wheat plants and acquisition of AYT1 resistance gene

پس از تعیین توالی ژنی فوق‌المذکر و انتقال به باکتری جهت تعیین ژن مقاومت با استفاده از روش Polymerase chain reaction در سیکل‌های حرارتی مختلف، روش مصنوعی آلوده‌سازی باکتریایی گندم، از طریق ساقه صورت گرفت. به این صورت که قطعاتی از ساقه گیاهان گندم در محلول آغشته به باکتری قوطه‌ور شدند و مدت زمان این کار به ۴۰ دقیقه تحت شرایط استریل در پتری‌دیش به طول انجامید. در این زمان باکتری فرصت کافی جهت نفوذ به ساقه‌های گندم را داشته است. پس از انجام این کار، ساقه‌ها با آب مقطر دوبار استریل شسته و مجددا به پتری‌دیش‌های تمیز انتقال یافتند. پس از گذشت ۴ روز در حالی که نمونه ها در شرایط خاص قرار گرفته بودند، استخراج پروتوئین، از نمونه‌ها انجام گرفت و با بررسی روند فعالیت آنزیمی، تعیین ژن مقاومت صورت گرفت. این آنزیم دارای غلظت ۵ واحد در میکرولیتر است، که برای هر واکنش مقدار ۰/۲ میکرولیتر استفاده گردید بنابراین در حجم نهایی واکنش ۲۰ میکرولیتر، ۱ واحد آنزیم وجود داشت. همچنین از گونه‌هایی استفاده شد که از نظر فعالیت پروتوئینی-آنزیمی در سطح مطلوبی نسبت به بقیه گیاهان بودند. که این عمل حاصل تحقیقات گذشته بود(Yiannikouris and Jouany, 2002). در این تحقیق از ۲۰ جفت آغازگر اختصاصی گندم که بر پایه مطالعات قبلی معرفی گردیده بودند. استفاده گردید.

ا ساس انتخاب آغازگرها بی شتر بر مبنای پیو ستگی با مکان‌های ژنی کنترل کننده صفات کمی است(Shima et al., 1997). همچنین، از مخلوط نوکلئوتیدی شرکت سیناژن (Cat. No. 7#0511) که حاوی ۱۰ میلی‌مولار از هر یک از نوکلئوتیدهای dTTP, dATP, dCTP, dGTP بود در انجام واکنش PCR ا ستفاده گرد ید (Mclauchlan et al., 2001). میزان مصرف در حجم واکنش ۲۰ میکرولیتر، ۰/۵ میکرولیتر بود.



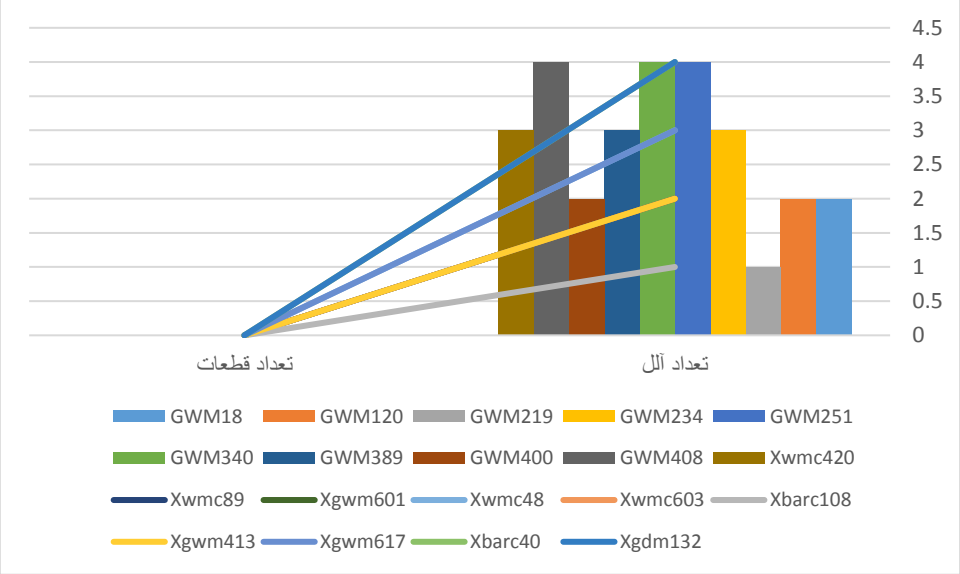
شکل 3-نتایج حاصل از بارگیری DNA استخراج شده بر روی ژل آگارز ۰/۸ درصد برای ۱۳ رقم گندم دوروم

Figure 3. Results of loading the extracted DNA on % 0.8 agarose gel

اگرچه نق شه های لینکاژی متعددی برای دامنه و سیعی از صفات در گونه‌های زراعی مختلف وجود دارد، اما در حقیقت ن شانگرهای به ن سبت اندکی در برنامه‌های ا صلاحی به صورت کاربردی به کار گرفته شده‌اند(نوری نیا و سادات، ۱۳۹۶). دلیل عمده کاربردی نبودن این نق شه‌ها، آن ا ست که نق شه‌های مورد ا ستفاده در پیش‌بینی فنوتیپ‌ها، مورد اطمینان نی ستند (He J et al., 2010).

اگرچه نتایج حا صل از این تحقیق ن شان داد که، از مخرب‌ترین بی ماری های گ ندم، بلا یت فوزاریومی ا ست که علاوه بر کاهش عملکرد مایکوتوک سین داک سی‌نیوالنول را، که یک ممانعت کننده از سنتز پروتئین است و سلامت انسان و دام را به خطر می‌اندازد، آلودگی فوزاریوم به dsRNA می‌توان ند در القای تحمل به داک سی‌نیوالنول و به دنبال آن افزایش تو لی د می ک ند(Binder and E.M, 2007)، ا ما ویژگی‌های ریخت شنا سی و بیماری‌زایی جدایه‌های *Fusarium graminearum* آ لوده به dsRNA د ستخوش تغییراتی مانند، کاهش شدت بیماری‌زایی و کاهش میزان مایکوتوک سین داک سی‌نیوالنول می شوند(Llorens et al., 2006). مطالعات گذ شته ن شان داده‌ا ند که بیان ا ستیل ترانس‌فراز مخمری (ScAYT1)،که یک ۳-O- تریکوتسین ا ستیل ترانس فراز است، و داکسی‌نیوالنول را به شکل استیل، آن که به مراتب سمیت پایین‌تری دارد تبدیل می‌کند، قادر ا ست ح سا سیت به مایکوتوک سین را در مخمرهای موتانت به شدت کاهش دهد(Jaynes,W.F et al., 2007). نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که بیان تراژن AYT1 و مقاومت به بیماری بلایت فوزاریومی سنبله گندم مؤثر باشند(Phillips, T.D et al., 1990). همچنین

به کاری‌گیری نشانگر های مولکولی از قبیل نشانگرهای SSR می‌تواند به طور موثری در دستیابی اولیه به ماهیت ژنتیکی قارچ‌ها، باکتری‌ها و گیاهان به نحو موثری مفید خواهد بود. در این پژوهش مشخص شد که، بلایت فوزاریومی سنبله گندم علاوه بر کاهش چشمگیر عملکرد، خسارت غیر مستقیمی از طریق تجمع مایکوتوکسین‌هایی مانند، دی‌اکسی‌نیوالنول به دانه‌های برداشت شده وارد می سازد. نبود منابع مقاومت در ارقام زراعی بر لزوم مطالعات در زمینه انتقال ژن‌های مؤثر در افزایش مقاومت به مایکوتوکسین‌های این بیماری افزوده است(Kubena et al., 1998). از جمله ژن‌های منتخب در این زمینه، ژن استیل ترانسفراز مخمری، AYT1 است که یک گروه استیل را جایگزین گروه هیدروکسیل C3 می‌کند و از سمیت آن‌ها به میزان قابل توجهی می کاهد (Karlovsky, 2011). ارزیابی های درون شیشه‌ای، دانه های گندم دوروم نوترکیب با AYT1 گویای افزایش تحمل نسبی به دی‌اکسی‌نیوالنول در نتیجه بیان تراژن یاد شده بوده است.



شکل۴. نشانگرهای مولکولی، قطعات تولید شده بر حسب (bp) و همچنین آلل‌های تولید شده توسط هر نشانگر

Figure 4. Molecular markers, components produced in (bp), as well as alleles produced by each marker

نتیجه گیری کلی

تحلیل مولکولی گیاهان تراریخت، با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن AYT1 و شرایط مشابه با شرایط تکثیر آن و DNA ژنومی استخراج شده از گیاهان، انتقال تراژن به لاین‌های باززایی شده، بررسی شد. نسخه‌برداری از تراژن یاد شده با تکثیر cDNA ساخته شده از RNA استخراجی با کیت(RN7613C .No .Cat) با اغازگرهای مورد استفاده تایید شد.

همچنین، برای جلوگیری از بروز جهش های ناخواسته از آنزیم polymerase DNA Expand که دارای توانایی پروف ریدینگ است استفاده شد(Fsrio, 2005). نتایج توالی یابی ژن هم سانه سازی شده در

پلاسمید نشان داد، که در سطح اسیدآمینه هیچ گونه تغییری در توالی این ژن در مراحل هم سانه سازی این ۲۰ رقم گندم دوروم رخ نداده است و صحت توالی ژن، AYT1 همسانه‌سازی شده پس از هم‌ردیفی با توالی موجود در بانک ژن تایید شد. تحلیل‌های آماری نشان داد، که اثر ژنوتیپ و محیط کشت و اثر متقابل آن ها بر تمامی شاخص‌های اندازه‌گیری شده در سطح ۰/۰۱ کاملا معنادار است. به عبارت روشن‌تر، عکس‌العمل گیاهچه‌های تراریخت و غیرتراریخت در حضور مایکوتوکسین با هم متفاوت بوده و بیان تراژن سبب تغییر در شاخص‌های اندازه‌گیری شده، به شکل معناداری شده است.

تشکر و قدردانی

بدینوسیله از زحمات و تلاش بی دریغ استاد محترم، سرکار خانم ندا باغستانی که در تهیه این مجموعه با این جانب همکاری داشته اند، تشکر و مراتب سپاس قلبی خود را اعلام نموده و موفقیت ایشان را ازخداوند متعال خواهانم.

فهرست منابع

Refferences

-**نوری نیا، س. ش، سادات. ۱۳۹٦.** بررسی تنوع ژنتیکی ژنوتیپ‌های متحمل به خشکی در گندم دوروم با استفاده از مارکرهای مولکولی SSR. مجله علمی-پژوهشی زراعت و اصلاح نباتات، پاییز ۱۳۹۶، صفحات ۴۹-۳۹.

-**Bai GH, Shaner G (1994).** Scab of wheat: prospects for control. Plant Disease 78: 760-766.

-**Binder, E.M. (2007).** Managing the risk of mycotoxins in modern feed production. Feed Science and Technology. 133:149-166.

-**Dellaporta, S.L., J. Wood and J. B. Hicks, (1983).** A plant DNA minipreparation: version II. Plant Mol. Biol. Rep. 1: 19.

-**Ellis MH, Spielmeyer W, Gale KR, Rebetzke GJ, Richards RA (2002).** ''Perfect'' markers for the Rht-B1b and Rht-D1b dwarfing genes. Theor Appl Genet 105:1038–1042 Endo TR, Gill BS (1996) The deletion stocks of common wheat. J Hered 87:295–307

-**Fsrio. (2005).** A focus on aflatoxin contamination. Food Safety Research Information Office. National Agricultural Library. Agricultural Research Service. United States Department of Agriculture. Available online at www.nal.usda.gov/fsrio/fsrio@nal.usda.gov.

-**He J, Zhou T, Young JC, Boland GJ, Scott PM (2010).** Chemical and biological transformations for detoxification of trichothecene mycotoxins in human and animal food chains. Trends in food Science and Technology 21: 67-76.

-**Irani Z, Sanjarian F, Azimi M.R (2015)**. Conversion of Deoxynivalenol to 3-acetyl deoxynivalenol in wheat and tobacco through the expression of Synthetic Acetyltransferase gene. Journal of Agricultural Biotechnology. Volume 7, Number 1, Spring.

-**Jaynes,W.F. Zartman, R.E. and Hudnall, W.H. (2007).** Aflatoxin B1 adsorption by clays from water and corn meal. Applied Clay Science. 36: 197–205.

-**Jefferies SP, Pallotta MA, Paull JG, Karakousis A, Kretschmer JM, Manning S, Islam AKMR, Langridge P, Chalmers KJ (2000)**. Mapping and validation of chromosome regions conferring boron toxicity tolerance in wheat (Triticum aestevum). Theor Appl Genet 101:767–777.

-**Kubena, L.F., Harvey, R.B., Bailey, R.H., Buckley, S.A. and Roninghaus G.E. (1998).** Effect of hydrated sodium calcium aluminosilicate (T-BinTM) on mycotoxicosis. Poultry Science. 77: 1502-1509.

-**Karlovsky P (2011).** Biological detoxification of the mycotoxin deoxynivalenol and its use in genetically engineered crops and feed additives. Applied Microbiology and Biotechnology 91: 491–504.

-**Llorens A, Hinojo M J, Mateo R, Gonzalez-Jaen M T, Valle-Algarra F M, Logrieco A, Jimenez M (2006).** Characterization of Fusarium spp. Isolates by PCR-RFLP analysis of the intergenic spacer region of the rRNA gene (rDNA). International Journal of Food Microbiology 106: 287-306.

-**Magan, N. (2006).** Mycotoxin contamination of food in Europe: Early detection and prevention strategies. Mycopathologia.162: 245–253.

-**Murashige T and Skoog F (1962).** A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum 15: 473-497.

-**Mclauchlan A, Ogbonnaya FC, Hollingsworth B, Carter M, Gale KR, Henry RJ, Holten TA, Morell MK, Rampling LR, Sharp PJ, Shariflou MR, Jones MGK, Appels R (2001).** Development of PCR-based DNA markers for each homoeo-allele of granule-bound starch synthase and their application in wheat breeding programs. Aust J Agric Res 52:1409–14.

-**Phillips, T.D., Clement, B.A., Kubena, L.F. and Harvey, R.B. (1990b).** Detection and detoxification of aflatoxins. Prevention of aflatoxicosis and aflatoxin.

-**Salunkhe DK, Kadam SS, Ausin A (1985)**. Quality of wheat and wheat products. Metropolition Book Co., New Delhi. 366.pp.

-**Shima J, Takase Sh, Iwai Y (1997).** Novel detoxification of the trichothecene mycotoxin Deoxynivalenol by a soil bacterium isolated by enrichment culture. Applied and Environmental Microbiology 63: 3825-3830.

-**Wegener M (1992)**. Optimierung Von Saatgutpillirungen mit mikrobiellen antagonisten zur biologischen Bekampfungvon *Fusarium culmorum* (W.G.SM.) Sacc. In Weizen. Diplomarbeit, Universtot Gottingen.

-**Yiannikouris, A. and Jouany, J. P. (2002**). Mycotoxins in feeds and their fate in homo and animals: a review. Animal Research. 51:81–89.

نشریه علمی زراعت و اصلاح نباتات ایران، جلد ۱۵، شماره ۳، پائیز ۱۳۹۸، صفحات ٦٤-٤٩

Molecular analysis and reduction of mycotoxin deoxynivalenol to 3-acetyl form in 20 durum wheat cultivars of Khuzestan through PCR technique and determination of AYT1 resistance gene

S. S. Noorinia[1], N. Baghestani[2]

Received date: 12 November 2020 Accepted date: 11 Murch 2021

Abstract:

This study was conducted to evaluate the response of 20 durum wheat cultivars native to Khuzestan, available in the collection of the grain research department of the Seed and Plant Breeding Research Institute, to Fusarium blight during the two cropping years 2016-2017 and 2018-2019 in field conditions in two regions. Different, Khuzestan, with two climatic conditions, was implemented. The studied traits included infected clusters, spikelet infestation, seed infestation, cluster density, plant height and biological yield. Cluster analysis was used to measure and determine genetic distances and pattern diversity in wheat Fusarium resistance components of wheat. Evaluation of experimental masses using sporulation method in the field showed that most of the studied masses have a good resistance to the disease in terms of the mean disease index. The cause of resistance seems to have a genetic basis and is related to the presence of type I resistance in them. Twenty durum wheat cultivars can be used as disease-resistant parents in crosses related to wheat breeding programs. The results showed that AYT1 gene is expressed as resistant gene in wheat cultivars. Using PCR technique and SSR molecular markers in this study in order to amplify a single copy or small copies of a DNA fragment with a specific sequence of thousands or millions of copies, to achieve the genetic nature of cultivars, this method can be used as a method. Introduced for the multiplication of resistant genes in this study.

Keywords: Fusarium blight of Durum wheat, SSR markers, mycotoxin, deoxynivalenol, PCR.

[1]- Author, Master of Biotechnology and Plant Breeding, Researcher.
2- Aythors, crop production expert.